

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 081 229 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.03.2001 Patentblatt 2001/10

(51) Int. Cl.⁷: **C12P 7/52, C12P 7/40,
C12P 11/00, C12N 1/20
// (C12N1/20, C12R1:01)**

(21) Anmeldenummer: **00117247.7**

(22) Anmeldetag: **14.08.2000**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

- **Gatfield, Ian-Lucas, Dr.**
37671 Höxter (DE)
- **Hilmer, Jens-Michael, Dr.**
37671 Höxter (DE)

(30) Priorität: **25.08.1999 EP 99116711**

(74) Vertreter:
Mann, Volker, Dr. et al
Bayer AG
Konzernzentrale RP
Patente und Lizenzen
D-51368 Leverkusen (DE)

(71) Anmelder: **HAARMANN & REIMER GMBH**
37601 Holzminden (DE)

(72) Erfinder:
• **Rabenhorst, Jürgen, Dr.**
37671 Höxter (DE)

Bemerkungen:
Das biologische Material ist bei DSM unter der (den)
Nummer(n) 12884 hinterlegt worden.

(54) **Fermentatives Verfahren zur Gewinnung natürlicher aromatischer, aliphatischer und Thiocarbonsäuren und Mikroorganismus dafür**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von aliphatischen, aromatischen und Thiocarbonsäuren, wobei Bakterien der Gattung Glucobacter enthaltende Kulturen eingesetzt werden.

EP 1 081 229 A1

Printed by Xerox (UK) Business Services
2.16.7 (HRS)/3.6

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein biologisches Verfahren zur Herstellung verschiedener Carbonsäuren durch die enzymatische Oxidation der entsprechenden Alkohole mit Alkoholoxidase in sehr hohen Ausbeuten. Die Alkoholoxydase wird von Bakterien der Gattung *Gluconobacter*, bevorzugt der Spezies *Gluconobacter* sp. HR 101 (DSM 12884), gebildet. So werden beispielsweise Benzoesäure aus Benzylalkohol, Buttersäure aus n-Butanol, Isobuttersäure aus Isobutanol, Isovaleriansäure aus Isoamylalkohol, 2-Methylbuttersäure aus 2-Methylbutanol, 3-Methylthiopropionsäure aus 3-Methylthiopropanol, Phenyllessigsäure aus Phenylethanol, Propionsäure aus Propanol und Zimtsäure aus Zimtalkohol hergestellt.

[0002] Neben dem lange bekannten Verfahren der Essigherstellung durch Oxidation von Ethanol zu Essigsäure mit Bakterien der Gattung *Acetobacter*, gibt es auch einige Verfahren zur Herstellung von einigen Carbonsäuren mit Bakterien der Gattungen *Acetobacter* oder *Gluconobacter* oder mit Hefen.

[0003] So beschreibt die DE 3713668 die Herstellung aliphatischer Carbonsäuren durch mikrobielle Oxidation aliphatischer Alkohole mit Bakterien der Spezies *Gluconobacter roseus*. Die Alkohole wurden dabei nach einer Wachstumsphase von über 24 Stunden direkt in das Kulturmedium mit dem Organismus gegeben. Der bevorzugte pH-Bereich wurde mit 4 bis 4,5 angegeben. Es wurden nur geringe Ausbeuten von 13 g n-Buttersäure/l, 21 g Isobuttersäure/l, 7 g 2-Methylbuttersäure/l und 17 g 3-Methylbuttersäure/l Fermentationslösung erhalten.

[0004] In der DE 195 03 598 wird ein Verfahren zur Herstellung von Propionsäure oder Buttersäure bzw. deren Salze beschrieben. Sie verwenden ein Bakterium der Spezies *Gluconobacter oxydans*. Nach 9 bis 10 stündiger Kultivation wurde n-Propanol oder n-Butanol portionsweise in Abhängigkeit vom pO_2 -Wert wiederholt zugegeben. Sie erzielten damit Ausbeuten von 43,7 g/L Propionsäure und 49 g/l Buttersäure.

[0005] In der EP 0563346 wird ein Verfahren zur Herstellung von Carbonsäuren durch Oxidation entsprechender Alkohole oder Aldehyde mit Hilfe einer Hefe der Gattung *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* oder *Kluyveromyces* beschrieben. Nachteilig ist hier, dass mit den Hefen nur niedrige Produktkonzentrationen erhalten werden, sehr hohe Biomassekonzentrationen eingesetzt werden müssen und lange Prozesszeiten. So wurden nach vier Tagen nur weniger als 0,6 g/L 3-Methylthiopropionsäure erhalten, und für die 90 %ige Umsetzung von 0,01 % Isoamylalkohol wurden 6 Tage benötigt.

[0006] In J. Chem.Tech.Biotechnol. 1997, 68, 214-218 wird die Biotransformation einiger aliphatischer Alkohole und 2-Phenylethanol in die entsprechenden Säuren mit Bakterien der Spezies *Acetobacter aceti* beschrieben. Nachteilig sind auch hier die geringen erhaltenen Produktkonzentrationen. So wurde die höchste beschriebene Produktkonzentration bei der Oxidation von Butanol zu Buttersäure mit 39,3 g/l nach 60 Stunden angegeben.

[0007] In J. Chem.Tech.Biotechnol. 1997, 70, 294-298 wird das Bakterium *Acetobacter pasteurianus* bei der oxidativen Herstellung bestimmter Carbonsäuren beschrieben. Von Nachteil ist hier die Verwendung von Air-lift Bioreaktoren, da durch den hohen Luftstrom, der für die Belüftung und Durchmischung der Kultur notwendig ist größere Mengen der flüchtigen Edukte und Produkte ausgetragen werden. Die aus diesem Grund dahinter angeschlossene Kühlfalle mit Flüssigstickstoff ist großtechnisch nicht praktikabel.

[0008] Es wurde ein Verfahren zur Herstellung von aliphatischen, aromatischen und Thiocarbonsäuren in Bioreaktoren gefunden, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.

[0009] Überraschend lassen sich mit den neuen Organismen der Gattung *Gluconobacter* sehr hohe Ausbeuten nicht nur an aliphatischen-, sondern auch an aromatischen- und thio-Carbonsäuren erzielen. Dies gilt sowohl in Hinsicht auf die Produktkonzentration in der Lösung, die prozentuale molare Umsetzung der Edukte als auch in Bezug auf die Raum-Zeit-Ausbeute. Dabei ist für den Prozess neben der Medienzusammensetzung und dem auf pH 6,4 gehaltenen pH-Wert, insbesondere die Art der kontinuierlichen Zugabe des Substrats von Bedeutung.

[0010] Als Bakterien werden bevorzugt für das erfindungsgemäße Verfahren Bakterien des Typs *Gluconobacter* sp. HR 101 (DSM 12884) eingesetzt.

[0011] Bevorzugt wird das Bakterium in Reinkultur eingesetzt.

[0012] Als Nährmedium für die erfindungsgemäß eingesetzten Organismen kommen synthetische, halbsynthetische oder komplexe Kulturmedien in Betracht. Diese können kohlenstoffhaltige und stickstoffhaltige Verbindungen, anorganische Salze, gegebenenfalls Spurenelemente sowie Vitamine enthalten.

[0013] Als kohlenstoffhaltige Verbindungen können Kohlenhydrate, Kohlenwasserstoffe oder organische Grundchemikalien in Betracht kommen. Beispiele für vorzugsweise verwendbare Verbindungen sind Zucker, Alkohole bzw. Zuckeralkohole, organische Säuren oder komplexe Gemische.

[0014] Als Zucker kommt vorzugsweise Glucose in Betracht. Als organische Säuren können vorzugsweise Zitronensäure oder Essigsäure zum Einsatz kommen. Zu den komplexen Gemischen zählen z. B. Malzextrakt, Hefeextrakt, Casein oder Caseinhydrolysat.

[0015] Als stickstoffhaltige Substrate kommen anorganische Verbindungen in Betracht. Beispiele hierfür sind Nitrate und Ammoniumsalze. Ebenso können organische Stickstoffquellen zum Einsatz kommen. Hierzu zählen Hefe-

extrakt, Sojamehl, Casein, Caseinhydrolysat und Maisquellwasser.

[0016] Zu den einsetzbaren anorganischen Salzen zählen beispielsweise Sulfate, Nitrate, Chloride, Carbonate und Phosphate. Als Metalle enthalten die genannte Salze vorzugsweise Natrium, Kalium, Magnesium, Mangan, Calcium, Zink und Eisen.

[0017] Die Temperatur für die Kultivierung liegt vorzugsweise im Bereich von 10 bis 40°C. Besonders bevorzugt ist der Bereich von 20 bis 35°C.

[0018] Der pH-Wert des Mediums beträgt bevorzugt 4 bis 8. Besonders bevorzugt ist der Bereich von 6,2 bis 6,5.

[0019] Grundsätzlich können für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens alle dem Fachmann bekannten Bioreaktoren eingesetzt werden. Vorzugsweise kommen alle für Submersverfahren geeigneten Vorrichtungen in Betracht. Das heißt, es können erfindungsgemäß Gefäße ohne oder mit mechanischer Mischeinrichtung eingesetzt werden. Zu ersteren zählen z. B. Schüttelapparaturen, Blasensäulen- oder Schlaufenreaktoren. Zu letzteren gehören vorzugsweise alle bekannten Vorrichtungen mit Rührern in beliebiger Gestaltung.

[0020] Das erfindungsgemäße Verfahren kann kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt werden. Die Dauer der Fermentation bis zum Erreichen einer maximalen Produktmenge hängt von der speziellen Art des eingesetzten Organismus ab. Grundsätzlich liegen die Zeiten der Fermentation jedoch zwischen 2 und 200 Stunden.

[0021] Aliphatische Carbonsäuren für das erfindungsgemäße Verfahren sind Buttersäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure, 2-Methylbuttersäure, und Propionsäure.

[0022] Aromatische Carbonsäuren für das erfindungsgemäße Verfahren sind Benzoesäure, Phenyllessigsäure und Zimtsäure.

[0023] Eine Thiocarbonsäure für das erfindungsgemäße Verfahren ist 3-Methylthiopropionsäure.

[0024] Bevorzugt werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Buttersäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure, 2-Methylbuttersäure, Propionsäure, Phenyllessigsäure und 3-Methylthiopropionsäure umgesetzt.

[0025] Insbesondere bevorzugt werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Isobuttersäure, Isovaleriansäure, 2-Methylbuttersäure und Phenyllessigsäure umgesetzt.

[0026] Im folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf Beispiele näher erläutert:

Beispiele

Beispiel 1 - Herstellung der Vorkultur

[0027] Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichem Einstich wird mit 100 ml sterilem Medium, bestehend aus 1,25 g D-Mannit und 0,75 g Hefeextrakt bei pH 6,5, mit 0,9 ml einer Glycerinkultur von *Gluconobacter* sp. HR 101 (DSM 12884) angeimpft. Der Kolben wird für 16 Stunden auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 30 °C und 140 Upm inkubiert. Die Keimzahl der Vorkultur beträgt ca. 2×10^9 KBE/ml.

Beispiel 2 - Herstellung von natürlicher n-Buttersäure aus natürlichem n-Butanol

[0028] Es werden 125 g Mannit und 75 g Hefeextrakt in 9,9 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0029] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 l/min; die Temperatur 30°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0030] Nach 17 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von n-Butanol über eine Pumpe begonnen. Die Dosierung des Substrats wird über einen Flow-Controller gesteuert. n-Butanol wird gemäß folgendem Flow-Profil zugegeben:

Fermentationszeit	Flussrate
0 h	0 g/lh
17 h	1,0 g/lh
20 h	4,0 g/lh
27 h	3,0 g/lh
30 h	2,5 g/lh
35 h	2,0 g/lh

EP 1 081 229 A1

(fortgesetzt)

Fermentationszeit	Flussrate
50 h	1,5 g/lh
50,5 h	2,0 g/lh
53 h	1,5 g/lh
57 h	1,0 g/lh
63 h	0 g/lh
66 h	1,0 g/lh
68 h	1,5 g/lh
71 h	1,0 g/lh
73 h	0 g/lh

[0031] Während des Feedings wird der pH-Wert im Bereich von 6,2 — 6,4 mit NH_4^+ konstant gehalten.

[0032] Die Fermentation ist nach 74 Stunden beendet. Die Endkonzentration an n-Buttersäure beträgt laut HPLC-Analytik 95 g/l. Die molare Umsetzung beträgt knapp 90 %.

Beispiel 3 - Herstellung von natürlicher Isobuttersäure aus Isobutanol

[0033] Es werden 125 g Mannit und 75 g Hefeextrakt in 9,9 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0034] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 NI/min; die Temperatur 30°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0035] Nach 22,5 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von Isobutanol über eine Pumpe begonnen. Die Dosierung des Substrats wird über einen Flow-Controller gesteuert. Isobutanol wird gemäß folgendem Flow-Profil zugegeben:

Fermentationszeit	Flussrate
0 h	0 g/lh
22,5 h	1,0 g/lh
23,5 h	4,0 g/lh
30 h	3,0 g/lh
35 h	2,5 g/lh
50 h	2,0 g/lh
50,3 h	2,5 g/lh
53 h	1,5 g/lh
58 h	1,0 g/lh
60 h	0 g/lh
64 h	1,0 g/lh
67 h	0 g/lh
68 h	1,5 g/lh
73 h	1,0 g/lh
74 h	0 g/lh

[0036] Während des Feedings wird der pH-Wert im Bereich von 6,2 — 6,4 mit NH_4^+ konstant gehalten.

[0037] Die Fermentation ist nach 74 Stunden beendet. Die Endkonzentration an Isobuttersäure beträgt laut HPLC-Analytik 92,7 g/l. Die molare Umsetzung beträgt knapp 88 %.

Beispiel 4 - Herstellung von natürlicher 2-Methylbuttersäure aus 2-Methylbutanol

[0038] Es werden 125 g Mannit und 75 g Hefeextrakt in 9,9 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0039] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 NI/min; die Temperatur 30°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0040] Nach 17 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von 2-Methylbutanol über eine Pumpe begonnen. Die Dosierung des Substrats wird über einen Flow-Controller gesteuert. 2-Methylbutanol wird gemäß folgendem Flow-Profil zugegeben:

Fermentationszeit	Flußrate
0 h	0 g/lh
17 h	1,0 g/lh
20 h	4,0 g/lh
28 h	3,5 g/lh
31 h	3,0 g/lh
35 h	2,5 g/lh
39 h	2,0 g/lh
45 h	1,5 g/lh
51 h	1,0 g/lh
55 h	0 g/lh

[0041] Während des Feedings wird der pH-Wert im Bereich von 6,2 — 6,4 mit NH_4^+ konstant gehalten.

[0042] Die Endkonzentration an 2-Methylbuttersäure beträgt laut HPLC-Analytik 80 g/l. Die molare Umsetzung beträgt knapp 89 %.

Beispiel 5 - Herstellung von natürlicher Isovaleriansäure aus Isoamylalkohol

[0043] Es werden 125 g Mannit und 75 g Hefeextrakt in 9,9 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0044] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 NI/min; die Temperatur 30°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0045] Nach 17 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von Isoamylalkohol über eine Pumpe begonnen. Die Dosierung des Substrats wird über einen Flow-Controller gesteuert. Isobutanol wird gemäß folgendem Flow-Profil zugegeben:

Fermentationszeit	Flussrate
0 h	0 g/lh
17 h	1,0 g/lh
20 h	4,0 g/lh

EP 1 081 229 A1

(fortgesetzt)

Fermentationszeit	Flussrate
28 h	3,5 g/lh
31 h	3,0 g/lh
35 h	2,5 g/lh
39 h	2,0 g/lh
44 h	1,5 g/lh
48 h	1,0 g/lh
49,5 h	0 g/lh
55 h	1,0 g/lh
58 h	0 g/lh
63 h	1,0 g/lh
66 h	0 g/lh

[0046] Während des Feedings wird der pH-Wert im Bereich von 6,2 — 6,4 mit NH_4^+ konstant gehalten.

[0047] Die Fermentation ist nach 70,5 Stunden beendet. Die Endkonzentration an Isovaleriansäure beträgt nach Aufarbeitung der Fermentationslösung 82 g/l. Die molare Umsetzung beträgt knapp 85 %.

Beispiel 6 - Herstellung von natürlicher Propionsäure aus n-Propanol

[0048] Es werden 125 g Mannit und 75 g Hefeextrakt in 9,9 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0049] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 l/min; die Temperatur 30°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0050] Nach 17 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von Propanol über eine Pumpe begonnen. Die Dosierung des Substrats wird über einen Flow-Controller gesteuert. Isobutanol wird gemäß folgendem Flow-Profil zugegeben:

Fermentationszeit	Flussrate
0 h	0 g/lh
17 h	1,0 g/lh
20 h	3,5 g/lh
27 h	3,0 g/lh
29 h	2,0 g/lh
35 h	1,5 g/lh
60 h	1,0 g/lh
82 h	0 g/lh
87 h	1,0 g/lh
90 h	0 g/lh

[0051] Während des Feedings wird der pH-Wert im Bereich von 6,2 — 6,4 mit NH_4^+ konstant gehalten.

[0052] Die Fermentation ist nach 92 Stunden beendet. Die Endkonzentration an Propionsäure beträgt laut HPLC-Analytik 94 g/l. Die molare Umsetzung beträgt 88,3%.

Beispiel 7 - Herstellung von natürlicher Phenyllessigsäure aus Phenylethanol

[0053] Es werden 125 g Mannit und 75 g Hefeextrakt in 9,9 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0054] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 l/min; die Temperatur 30°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0055] Nach 17 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von Phenylethylalkohol über eine Pumpe begonnen. Die Dosierung des Substrats wird über einen Flow-Controller gesteuert. Phenylethylalkohol wird gemäß folgendem Flow-Profil zugegeben:

Fermentationszeit	Flussrate
0 h	0 g/lh
17 h	1,0 g/lh
20 h	4,0 g/lh
23,5 h	2,0 g/lh
24 h	2,5 g/lh
30 h	2,0 g/lh
37 h	1,5 g/lh
41 h	1,0 g/lh
43,8 h	0 g/lh
50,5 h	1,0 g/lh
53 h	0 g/lh
58 h	1,0 g/lh
60 h	0 g/lh
65 h	1,0 g/lh
67 h	0 g/lh

[0056] Während des Feedings wird der pH-Wert im Bereich von 6,2 - 6,4 mit NH_4^+ konstant gehalten.

[0057] Die maximale Produktkonzentration wird nach 48 Stunden erreicht. Die Konzentration an Phenyllessigsäure beträgt laut HPLC-Analytik 54 g/l. Die molare Umsetzung beträgt 88,5 %.

[0058] Bei Übertragung des Prozesses auf den 200 l Maßstab wurden 52 g/l erhalten; die molare Umsetzung lag hier bei 95 %.

Beispiel 8 - Herstellung von natürlicher Benzoesäure aus Benzylalkohol

[0059] Es werden 125 g Mannit und 75 g Hefeextrakt in 9,9 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0060] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 l/min; die Temperatur 30°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0061] Nach 21,25 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von Benzylalkohol über eine Pumpe begonnen. Die Dosierung des Substrats wird über einen Flow-Controller gesteuert. Benzylalkohol wird gemäß folgendem Flow-Profil zugegeben:

5

10

15

20

25

Fermentationszeit	Flussrate
0 h	0 g/lh
21,25 h	1,0 g/lh
23 h	3,0 g/lh
28 h	2,5 g/lh
31 h	2,0 g/lh
34 h	1,5 g/lh
37 h	1,0 g/lh
40 h	0 g/lh
43 h	1,0 g/lh
47,5 h	0 g/lh
50,5 h	1,0 g/lh
54 h	0 g/lh
57 h	1,0 g/lh
60 h	0 g/lh
63 h	1,0 g/lh
65 h	0 g/lh

30

[0062] Während des Feedings wird der pH-Wert im Bereich von 6,2 — 6,4 mit NH_4^+ konstant gehalten.

[0063] Die Fermentation ist nach 68 Stunden beendet. Die Endkonzentration an Benzoesäure beträgt laut HPLC-Analytik 51 g/l. Das Edukt wurde nahezu quantitativ umgesetzt.

Beispiel 9 - Herstellung von natürlicher Zimtsäure aus Zimtalkohol

35

[0064] Es werden 125 g Mannit und 75 g Hefeextrakt in 9,9 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

40

[0065] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 NI/min; die Temperatur 30°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0066] Nach 17 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von Zimtalkohol über eine Pumpe begonnen. Um den Zimtalkohol in der flüssigen Phase zu haben, wurde das Edukt erwärmt. Zimtalkohol wird gemäß folgendem Flow-Profil zugegeben:

45

50

55

Fermentationszeit	Flussrate
0 h	0 g/lh
17 h	1,2 g/lh
20 h	2,4 g/lh
21 h	3,6 g/lh
25,25 h	0 g/lh
26,25 h	2,4 g/lh
28 h	1,2 g/lh

(fortgesetzt)

Fermentationszeit	Flussrate
30 h	0 g/lh
31 h	1,2 g/lh
32 h	0 g/lh

[0067] Die Fermentation ist nach 44 Stunden beendet. Die Endkonzentration an Zimtsäure beträgt laut HPLC-Analytik 27 g/l. Das Edukt wurde nahezu quantitativ umgesetzt.

Beispiel 10 Herstellung von natürlicher 3-Methylthiopropionsäure aus 3-Methylthiopropanol

[0068] Es werden 125 g Mannit und 125 g Hefeextrakt in 10 l Wasser in einem 10 l Fermenter gelöst, 10 ml Antischaummittel hinzu gegeben und der pH-Wert auf 6,3 eingestellt. Das so hergestellte Medium wird für 30 Minuten bei 121°C sterilisiert.

[0069] Die Drehzahl des Rührers beträgt 500 Upm, die Belüftung 5 NI/min; die Temperatur 27°C. Nach Einstellung dieser Parameter wird die Vorkultur gemäß Beispiel 1 zum Animpfen verwendet.

[0070] Nach 16 Stunden Fermentationszeit wird mit der Zugabe von 3-Methylthiopropanol über eine Pumpe begonnen. Die Dosierung des Substrats erfolgt gemäß folgendem Flow-Profil:

Fermentationszeit	Flussrate
0 h	0 g/lh
16 h	1,0 g/lh
17,66 h	2,0 g/lh
19 h	3,0 g/lh
20,8 h	4,2 g/lh
21,8 h	4,8 g/lh
23,2 h	4,2 g/lh
23,8 h	2,6 g/lh
42,5 h	2,2 g/lh
48,8 h	0 g/lh

[0071] Während des Feedings wird der pH-Wert im Bereich von 6,2 — 6,4 mit NH_4^+ konstant gehalten.

[0072] Die Fermentation ist nach 65 Stunden beendet. Die Endkonzentration an 3-Methylthiopropionsäure beträgt laut HPLC-Analytik 82,6 g/l. Die molare Umsetzung beträgt fast 100 %.

Beispiel 12 Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeute des erfindungsgemäßen Verfahrens mit bekannten Verfahren:

[0073] Im folgenden Beispiel werden die Raum-Zeit-Ausbeuten der neuen Produktionsverfahrens mit dem *Glucobacter* sp. DSM 12884 mit den bisher bekannten Verfahren verglichen, um die Überlegenheit des neuen Prozesses zu verdeutlichen.

Produkt	Prozessdauer [Stunden]	Produktkonzentration [g/l]	Raum-Zeit-Ausbeute [g/l/Std.]	Prozess
Buttersäure	120	13	0,11	DE-A 37 13 668

(fortgesetzt)

	Produkt	Prozessdauer [Stunden]	Produktkonzentration [g/l]	Raum-Zeit-Ausbeute [g/lStd.]	Prozess
5	Buttersäure	60	39,3	0,66	J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997, 68, 214-218
	Buttersäure	80	49	0,61	DE-A 195 03 598
10	Buttersäure	90	60	0,67	J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997, 70, 294-298
	Buttersäure	73	95	1,3	Erfindung
15	Propionsäure	70	43,7	0,62	DE-A 195 03 598
	Propionsäure	90	60	0,67	J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997, 70, 294-298
20	Propionsäure	92	94	1,02	Erfindung
	Isobuttersäure	42	21	0,5	DE-A 37 13 668
	Isobuttersäure	74	92,7	1,25	Erfindung
	Isovaleriansäure	25	17	0,68	DE-A 37 13 668
25	Isovaleriansäure	90	45	0,5	J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997, 70, 294-298
	Isovaleriansäure	70,5	82	1,16	Erfindung
30	2-Methylbuttersäure	24	7	0,29	DE-A 37 13 668
	2-Methylbuttersäure	90	44	0,49	J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997, 70, 294-298
35	2-Methylbuttersäure	52	80	1,54	Erfindung

40 **[0074]** Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, ist mit dem neuen Prozess mit *Gluconobacter* sp. DSM 12884 bei den schon beschriebenen Alkoholoxidationen eine enorme Steigerung sowohl der Raum-Zeit-Ausbeute als auch in der absoluten Produktkonzentration zu verzeichnen. So erhöht sich bei Buttersäure die Raum-Zeit-Ausbeute um 94 % und die Produktkonzentration um 58 % gegenüber dem bisher besten Prozess. Bei Propionsäure erhöht sich die Raum-Zeit-Ausbeute um 52 % und die Produktkonzentration um 57 %. Noch höher sind die Steigerungen bei Isobuttersäure mit 150 % bei der Raum-Zeit-Ausbeute und 341 % bei der Produktkonzentration. Die Steigerungen für Isovaleriansäure und 2-Methylbuttersäure sind 132 % und 82 %, bzw. 214 % und 82 %.

Patentansprüche

- 50 1. Verfahren zur Herstellung von aliphatischen, aromatischen und Thio-Carbonsäuren in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
- 55 2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass eine aus Bakterien der Gattung *Gluconobacter* bestehende Reinkultur eingesetzt wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, dass *Gluconobacter* sp. HR 101 (DSM 12884) eingesetzt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, dass synthetische, halbsynthetische oder komplexe Substrate eingesetzt werden.
- 5 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, dass kohlenstoffhaltige sowie stickstoffhaltige Verbindungen, anorganische Salze, Spurenelemente und/oder Vitamine enthaltende Substrate eingesetzt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat als kohlenstoffhaltige Verbindungen Zucker, Zuckeralkohole, Alkohol, organische Säuren, komplexe Gemische, Öle oder Gemische zweier oder mehrerer dieser Substanzen enthält.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6 dadurch gekennzeichnet, dass Glucose, Glycerin, Mannit, Zitronensäure, Malzextrakt, Hefeextrakt, Casein, Caseinhydrolysat und Rizinusöl oder Gemische zweier oder mehrerer dieser Substanzen enthaltende Substrate eingesetzt werden.
- 15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, dass anorganische Verbindungen und/oder organische Verbindungen enthaltenden Substrate eingesetzt werden.
- 20 9. Verfahren nach Anspruch 8 dadurch gekennzeichnet, dass Nitrate, Ammoniumsalze, Hefeextrakt, Sojamehl, Baumwollsaatmehl, Casein, Caseinhydrolysat, Weizengluten und Maisquellwasser eingesetzt werden.
- 25 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 dadurch gekennzeichnet, Sulfate, Nitrate, Chloride, Carbonate und Phosphate der Metalle Natrium, Kalium, Magnesium, Mangan, Calcium, Zink und Eisen oder Gemische zweier oder mehrerer dieser Verbindungen enthaltende Substrate eingesetzt werden.
- 30 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Temperaturen im Bereich von 10 bis 40°C liegen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11 dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert im Bereich von 4 bis 8 liegt.
- 35 13. *Gluconobacter* sp. HR 101 (DSM 12884).
14. Verwendung von *Gluconobacter* sp. nach Anspruch 13 zur Herstellung von aliphatischen, aromatischen und Thiocarbonsäuren.
- 40 15. Verfahren zur Herstellung von aliphatischen, aromatischen und Thiocarbonsäuren dadurch gekennzeichnet, dass die molare Umsetzung der Substrate größer als 60 % ist.
16. Verfahren zur Herstellung von natürlicher Buttersäure in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
- 45 17. Verfahren zur Herstellung von Isobuttersäure in Bioreaktoren dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
18. Verfahren zur Herstellung von Isovaleriansäure in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
- 50 19. Verfahren zur Herstellung von 2-Methylbuttersäure in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
20. Verfahren zur Herstellung von Propionsäure in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
- 55 21. Verfahren zur Herstellung von Benzoesäure in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
22. Verfahren zur Herstellung von Phenylelessigsäure in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der

Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.

23. Verfahren zur Herstellung von Zimtsäure in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
24. Verfahren zur Herstellung von 3-Methylthiopropionsäure in Bioreaktoren, dadurch gekennzeichnet, dass Bakterien der Gattung *Gluconobacter* enthaltende Kulturen eingesetzt werden.
25. Verfahren nach den Ansprüchen 16 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass eine aus Bakterien der Gattung *Gluconobacter* bestehende Reinkultur eingesetzt wird.
26. Verfahren nach den Ansprüchen 16 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass *Gluconobacter* sp. HR 101 (DSM 12884) eingesetzt wird.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung
EP 00 11 7247

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	US 5 468 627 A (GATFIELD IAN ET AL) 21. November 1995 (1995-11-21) * das ganze Dokument *	1,2, 4-12, 15-19,25	C12P7/52 C12P7/40 C12P11/00 C12N1/20 //(C12N1/20, C12R1:01)
X	EP 0 289 822 A (HAARMANN & REIMER GMBH) 9. November 1988 (1988-11-09) * das ganze Dokument *	1,2, 4-12,15, 17-19,25	
D,X	DE 195 03 598 A (CULLY ZUZANA DR) 8. August 1996 (1996-08-08) * das ganze Dokument *	1,2, 4-12,15, 16,20,25	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			C12P C12N C12R
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPU in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche</p> <p>Siehe Ergänzungsblatt C</p>			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 18. Dezember 2000	Prüfer Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		<p>T der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>D in der Anmeldung angeführtes Dokument</p> <p>L aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>	
<p>X von besonderer Bedeutung allein betrachtet</p> <p>Y von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</p> <p>A technologischer Hintergrund</p> <p>O nichtschriftliche Offenbarung</p> <p>P Zwischenliteratur</p>			

EPC FORM 1503 03 82 (P/C/39)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 00 11 7247

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
D,X	<p>MOLINARI F ET AL: "MULTIGRAM-SCALE PRODUCTION OF ALIPHATIC CARBOXYLIC ACIDS BY OXIDATION OF ALCOHOLS WITH ACETOBACTER PASTEURIANUS NCIMB 11664" JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. (INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOTECHNICAL AND CHEMICAL PROCESSES), 68, ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS. BARKING, Bd. 70, Nr. 3, 1. November 1997 (1997-11-01), Seiten 294-298, XP000750796 ISSN: 0268-2575 * Tabelle 1 *</p>	1,2, 4-12, 15, 16, 18-20, 25	
D,X	<p>DRUAUX D ET AL: "BACTERIAL BIOCONVERSION OF PRIMARY ALIPHATIC AND AROMATIC ALCOHOLS INTO ACIDS: EFFECTS OF MOLECULAR STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL CONDITIONS" JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. (INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOTECHNICAL AND CHEMICAL PROCESSES), 68, ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS. BARKING, Bd. 68, Nr. 2, 1. Februar 1997 (1997-02-01), Seiten 214-218, XP000690930 ISSN: 0268-2575 * Seite 214, linke Spalte, Zeile 1 - Zeile 8 * * Seite 215, linke Spalte, Zeile 3 - Zeile 6 *</p>	1,2, 4-12, 15, 17, 25	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
X	<p>EP 0 606 621 A (HOFFMANN LA ROCHE) 20. Juli 1994 (1994-07-20) * Ansprüche 1-11; Tabellen 1,4,5 * ----- -/-</p>	1,2, 4-12, 15-17, 20, 25	

EPO FORM 150 (12.12.92) (P/Int.Cl.7)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 00 11 7247

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
X	EP 0 832 974 A (HOFFMANN LA ROCHE) 1. April 1998 (1998-04-01) * Seite 4, Zeile 16 - Zeile 21; Ansprüche 1-15 *	1,2, 4-12,14	
X	EP 0 756 002 A (KANSAI PAINT CO LTD) 29. Januar 1997 (1997-01-29) * Seite 3, rechte Spalte, Zeile 17 - Zeile 21 * * Seite 5, Spalte 8, Zeile 28 - Zeile 37 *	1,2,25	
A	CH 686 003 A (LONZA AG GAMPEL WALLIS GESCHOFF) 30. November 1995 (1995-11-30) * das ganze Dokument *		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
A	EP 0 366 922 A (HOFFMANN LA ROCHE) 9. Mai 1990 (1990-05-09) * Seite 10, Zeile 1 - Zeile 15 *		
A	US 4 826 768 A (CHOU KECHIA J) 2. Mai 1989 (1989-05-02)		
D,A	WO 93 08293 A (FIRMENICH & CIE) 29. April 1993 (1993-04-29) * das ganze Dokument *		

EPO FORM 150 (5.12.94) (PNC/12)



Europäisches
Patentamt

UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE
ERGÄNZUNGSBLATT C

Nummer der Anmeldung
EP 00 11 7247

Vollständig recherchierte Ansprüche:
1,2,4-12,15-25

Unvollständig recherchierte Ansprüche:
3,13,14,26

Grund für die Beschränkung der Recherche:

Die geltenden Patentansprüche 3,13,14 und 26 beziehen sich auf eine Spezies von Bakterien der Gattung *Gluconobacter* HR 101, bzw. ihre Verwendung in der Herstellung von aliphatischen, aromatischen und Thiocarbonsäuren. Angesichts des Inhalts der geltenden Patentansprüche, welche es damit erschweren wenn nicht gar unmöglich machen, den durch sie erstrebten Schutzzumfang zu bestimmen, entspricht die vorliegende Patentanmeldung den Anforderungen des Artikels 84 EPÜ (vgl. auch Regel 29.5 EPÜ) in einem Maße nicht, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als offenbart erscheinen nämlich auf eine Spezies der Gattung *Gluconobacter* und ihre Verwendung in der Herstellung von aliphatischen, aroma- tischen und Thiocarbonsäuren.

Desweiteren wurde Anspruch 15 in Abhängigkeit von Anspruch 1 recherchiert.

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 00 11 7247

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

18-12-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5468627	A	21-11-1995	KEINE		
EP 0289822	A	09-11-1988	DE	3713668 A	17-11-1988
			DE	3866414 A	09-01-1992
			ES	2028163 T	01-07-1992
			JP	2679727 B	19-11-1997
			JP	63283588 A	21-11-1988
DE 19503598	A	08-08-1996	KEINE		
EP 0606621	A	20-07-1994	JP	7000182 A	06-01-1995
			US	5437989 A	01-08-1995
			US	5932463 A	03-08-1999
			US	5916785 A	29-06-1999
EP 0832974	A	01-04-1998	BR	9704748 A	10-11-1998
			CN	1183472 A	03-06-1998
			JP	10229885 A	02-09-1998
EP 0756002	A	29-01-1997	JP	9037766 A	10-02-1997
			US	5707825 A	13-01-1998
CH 686003	A	30-11-1995	KEINE		
EP 0366922	A	09-05-1990	AT	106451 T	15-06-1994
			DE	68915692 D	07-07-1994
			DE	68915692 T	12-01-1995
			DK	459989 A	31-03-1990
			JP	2150287 A	08-06-1990
			JP	2825551 B	18-11-1998
			US	4960695 A	02-10-1990
US 4826768	A	02-05-1989	KEINE		
WO 9308293	A	29-04-1993	DE	69217646 D	03-04-1997
			DE	69217646 T	12-06-1997
			EP	0563346 A	06-10-1993
			JP	6504447 T	26-05-1994
			US	5599700 A	04-02-1997

EPO FORM P42/1

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82